

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-205676

(43)Date of publication of application : 26.07.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/10

(21)Application number : 04-350818 (71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 04.12.1992 (72)Inventor : OU ROU
ISHIZAWA KATSUMI
HIRAYASU KAZUNARI

(54) METHOD FOR EXTRACTING DNA FROM WHOLE BLOOD SPECIMEN AND EXTRACTION KIT

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent the damage and contamination and obtain the subject DNA by adding a surfactant to the whole blood specimen, destroying a hemocytic cell, destroying a nuclear membrane and a nuclear protein with the surfactant and a proteolytic enzyme, then liberating a DNA chain with a chaotropic agent and precipitating the DNA chain.

CONSTITUTION: A surfactant such as a nonionic surfactant (e.g. polyoxyethylene octylphenyl ether) is brought into contact with the whole blood specimen to destroy the cell membrane of a hemocytic cell. The exposed cell nucleus is then collected and treated with the nonionic surfactant (e.g. sodium dodecyl sulfate) and a proteolytic enzyme (e.g. proteinase K) to destroy a nuclear membrane and a nuclear protein. The resultant cell nucleus is subsequently brought into contact with a chaotropic agent (e.g. sodium iodide) to liberate a DNA chain. An alcohol (e.g. isopropanol) is then added to a solution containing the liberated DNA chain to precipitate the DNA chain. Thereby, the damage and contamination of the DNA chain in an extraction process are suppressed to readily extract the DNA useful for gene diagnosis, etc., such as genetic diseases or cancer.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.11.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]	3018802
[Date of registration]	07.01.2000
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-205676

(43)公開日 平成6年(1994)7月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数16 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-350818

(22)出願日 平成4年(1992)12月4日

(71)出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72)発明者 王 ▲ろう▼

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72)発明者 石澤 勝己

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72)発明者 平安 一成

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54)【発明の名称】 全血液検体からのDNA抽出方法及び抽出キット

(57)【要約】

【構成】 本発明は、全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈澱させることを特徴とするDNA鎖抽出方法及びキットである。

【効果】 本発明はDNA鎖抽出過程に於て、有機溶媒の代わりにカオトロピック剤を用いることにより、その後の有機溶媒を除去する過程を省略することができ、操作手順が簡略化されること、始めから終わりまで同じ容器で抽出操作が行えるので、抽出過程でのDNA鎖の損傷、汚染の危険性を最小限に止められること、更にその結果、従来法に比べて高分子のDNA鎖を高精度で抽出できる。また、全血を用いることができるため、血液試料を各細胞成分に分離する繁雑さが解消し、採取後短時間に試料を処理することができる等の点に於て極めて優れた発明であり斯業に貢献するところ大なる発明である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈殿させることを特徴とするDNA鎖抽出方法。

【請求項2】細胞膜を破壊するための界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項1に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項3】非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである、請求項2に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項4】核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である、請求項1～3の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項5】陰イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと略記する。）である、請求項4に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項6】蛋白質分解酵素がプロティナーゼKである、請求項1～5の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項7】カオトロピック剤がよう化ナトリウムである、請求項1～6の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項8】アルコール類がイソプロパノールである、請求項1～7の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項9】①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白質分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類を含んで成ることを特徴とする、全血液検体からのDNA鎖抽出キット。

【請求項10】細胞膜を破壊するための界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項9に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項11】非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである、請求項10に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項12】核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である、請求項9～11の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項13】陰イオン性界面活性剤がSDSである、請求項12に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項14】蛋白質分解酵素がプロティナーゼKである、請求項9～13の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項15】カオトロピック剤がよう化ナトリウムである、請求項9～14の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項16】アルコール類がイソプロパノールである、請求項9～15の何れかに記載のDNA鎖抽出キッ

ト。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は全血液からのDNA鎖の抽出方法及び抽出キットに関する。

【発明の背景】遺伝子疾患の出生前診断や保因子の発見、DNAの多型或は遺伝病や癌などDNAの異常に起因する疾病の原因領域の究明のために、ヒトの遺伝子を抽出、分析する研究が行われている。また、例えばB型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス等のウイルス性疾患、腫瘍、血有病等の遺伝疾患の診断を、DNAを分析して行う方法が最近盛んになりつつある。また、ヒト・ゲノム・プロジェクトに代表されるように、ヒトの全遺伝情報を解析する研究も盛んに行われているが、遺伝子を分析するには傷をつけずに高分子の状態を保ったままゲノムDNAを調製する必要がある。しかしながら原核生物と異なり、真核生物、特にヒトに代表される高等生物のDNA分子は巨大で、攪拌操作等によって容易に切断されてしまうため、十分注意を払っても、全く損傷を与えることなくDNA分子を抽出することは不可能である。またクロマチン等の核蛋白質が強固にDNA分子と結合しているため、これら核蛋白質の除去操作も必要であり、完全なDNAを精製することはできない。

【0002】従来の方法は、例えば細胞を物理的に、又は界面活性剤等で処理して破壊後、水飽和フェノールやクロロホルム等の有機溶媒を用いて不純物を除去し、次いでアルコールで溶液中のDNA鎖を沈殿させる方法、更にカラムクロマトグラフィーにより精製する方法が一般的である（生化学実験講座2、「核酸の化学1」,74～80頁,262～270頁,1975年,東京化学同人、「遺伝子操作マニュアル」,20～23頁,1985年,講談社、他）。しかし、これらの方法ではフェノール、クロロホルムを使用する必要があり、有機溶媒層とDNA層を分離操作する手間或はカラムクロマトグラフィーを行う手間を要するといった欠点を持っている。また、操作が煩雑なため、DNA鎖に傷をつける可能性が高い。また抽出操作中に何回もDNA層を別の容器に移し変えるので、使用容器が細菌等に汚染されていたりすると、試料以外の、これら細菌等の外来DNAが混入してしまう危険性がある。また、これらのこともDNA鎖の抽出効率を悪くしている。更に、抽出操作に用いられるフェノールには、従来①毒性があり、且つ強い蛋白質変性剤であるため、皮膚に接触すると薬傷を引き起こす、②また保存中にフェノールが変性して二価フェノール、キノン等のフェノール性酸化物が生成した場合には、これら酸化物がホスホジエステル結合又はDNA鎖の架橋結合を開裂させて、核酸鎖の変性を引き起こしたりする、等の問題点が、また、クロロホルムやジエチルエーテルには麻酔作用があるため、使用時に中毒を起こす可能性があるという問題点が、更にはフェノールや上記有機溶媒を含む溶液は廃

棄の際に制約を受けるという問題点がある。

【0003】一方、イオン半径の大きな1価の陰イオンを出すカオトロピック剤が蛋白変性剤の一つとして知られていた。カオトロピック剤は水に溶解してカオトロピックイオンを放出し、疎水結合を弱めることが知られており、蛋白質の変性や、膜蛋白質の抽出に用いられてきた。しかしながら、従来は、フェノールには前記した如き種々の問題点があるにも関わらず、血液中のDNA抽出にはこれを蛋白変性剤として用いる方法が一般的であり、カオトロピック剤を血液検体からのDNA抽出に用いようとする試みは今までなされていなかった。

【0004】

【発明の目的】本発明は上記欠点を解決し、DNA鎖を高分子のまま高精度に且つ容易に抽出する方法及び抽出キットを提供することを目的とする。

【発明の構成】本発明は、全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈澱させることを特徴とするDNA鎖抽出方法の発明である。また、本発明は①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類を含んで成ることを特徴とする、全血液検体からのDNA鎖抽出キットの発明である。

【0005】即ち本発明者等は、血液検体から核酸鎖を有効に抽出する方法について鋭意研究の結果、DNA鎖抽出の過程に於て、従来のフェノール、クロロホルム等の有機溶媒を用いる代わりにカオトロピック剤を用いることが可能なことを見出し、更に、カオトロピック剤を使用することにより、その後の有機溶媒を除去する過程を省略することができるので、操作手順が簡略化されること、DNA層を何回も別の容器に移し変えることなく初めから終わりまで同じ容器で抽出操作が行えるので、DNA鎖抽出過程に於けるDNA鎖の損傷、汚染の危険性を最小限に止められること、更にその結果、従来のフェノールを用いた抽出法に比べて高分子のDNA鎖を高精度で抽出できることを見出し、本発明を完成するに

【0006】本発明に於て用いられる界面活性剤としては、一般に細胞、細菌等から核酸鎖抽出の際に用いられるものであれば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等、特に限定されことなく挙げられるが、具体的には例えばドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン性界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する。)、コール

酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(例えばローム アンド ハース社商品名:トリトンX-100等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(例えば花王(株)商品名:トウイーン20等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(例えば花王(株)商品名:ウィーン80等)、n-オクチル-β-D-グルコシド等の非イオン界面活性剤、例えば3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が好ましく挙げられる。中でも、特に例えば血球細胞を破壊する際にはポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等の非イオン性界面活性剤が、例えば蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する際にはSDS等の陰イオン性界面活性剤が好ましく用いられる。これらの使用濃度としては、使用する界面活性剤の種類により多少異なるが、例えば血球細胞を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。また、蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。

【0007】本発明に於て用いられる蛋白質分解酵素としては、例えばプロティナーゼK、プロナーゼ又はリゾチーム等が挙げられるが特にこれらに限定されない。また、これらの使用濃度としては、通常1~10mg/mlの範囲で用いられる。本発明に於て用いられるカオトロピック剤としては、一般にカオトロピック剤として知られているような、水溶液に添加した際にカオトロピックイオン(イオン半径の大きな1価の陰イオン)を生成し、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しているものであれば特に限定されことなく挙げられるが、具体的には例えばよう化アルカリ、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸のアルカリ金属塩、トリフルオロ酢酸のアルカリ金属塩、トリクロロ酢酸のアルカリ金属塩、及びチオシアン酸のアルカリ金属塩等が挙げられる。これらアルカリ金属塩或はよう化アルカリに於けるアルカリ金属の例としては、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム等が挙げられる。これらカオトロピック剤の使用濃度は、用いるカオトロピック剤の種類により多少異なるが、一般に溶液中の濃度として2~6Mの範囲で用いられる。特に、よう化ナトリウムを使用する場合には、溶液中の濃度が約3.5~5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0008】本発明に於て用いられる抽出溶液中からDNA鎖を沈澱させる方法としては、例えばDNA鎖抽出溶液に、イソプロパノール、エタノール等のアルコール類を添加し、DNA鎖を特異的に沈澱させることによりDNA鎖を回収する方法等が挙げられる。本発明に於て抽出溶液中からDNA鎖を沈澱させる際に用いられるア

ルコール類としては、DNA鎖を特異的に沈殿し得る性質を有するものであれば特に限定することなく挙げられるが、具体的には例えばイソプロパノール、エタノール等のアルコール類が挙げられ、特にイソプロパノールが好ましく用いられる。またカオトロピック剤としてよう化ナトリウムを用いる場合には、特にイソプロパノールを用いてDNA鎖の沈殿を行うことがより好ましい。これらの使用濃度としては、DNA鎖が水溶液から沈殿するような濃度であればよく、特に限定されない。

【0009】本発明に於て用いられる、例えば緩衝剤等の試薬類としては、従来この分野で用いられているものの中から適宜選択して用いられればよく、その使用濃度も通常この分野で用いられる範囲から適宜選択すれば足りる。例えば緩衝剤としては、例えばリン酸塩、クエン酸塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下、トリスと略記する。)、グリシン等が好ましく挙げられ、その使用濃度としてはDNAの遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、通常1~500mMの範囲が好ましく挙げられる。また、抽出操作に於て用いられる水(緩衝液も含む)のpHとしては、DNA鎖の遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、通常2~12の範囲、好ましくは7~9の範囲から適宜選択される。更に、本発明の抽出方法に於て用いられる緩衝液等の水溶液中には、DNA鎖の分離効率を良くするために、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化リチウム等の塩類等が添加されていても良い。これらの該水溶液中の濃度としては、DNA鎖の遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、該水溶液中の濃度として通常1~500mMの範囲で必要に応じて添加される。

【0010】尚、本発明は通常例えばエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略記する。)等のDNaseの阻害剤の共存下で実施することが好ましい。これら阻害剤の使用濃度としては、阻害剤の種類により異なるが、例えばEDTAを用いる場合には、一連の操作に於ける各溶液中の濃度として通常1~200mMの範囲が好ましく挙げられる。

【0011】本発明に係るDNA鎖の抽出方法を具体的に示すと、例えば下記の如くなる。採取した血液試料を全血のまま(EDTA、ヘパリン等の抗血液凝固剤を含んでいてもよい)ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等の界面活性剤を含む溶液に懸濁して血液細胞を破壊した後、遠心分離を行い、核画分を含む沈殿物を得る。続いて得られた核画分を含む沈殿物にSDS等の界面活性剤及びプロテイナーゼK等のプロテアーゼを加えて一定時間処理し、核膜、核蛋白質等を破壊する。続いてよう化ナトリウム等のカオトロピック剤を加えて*

DNAの抽出効率(%)

*混合した後、イソプロパノール等のアルコール類を加えてDNA鎖を沈殿、精製する。本発明の方法は、例えば、①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類をを組み合わせる試薬キットを用いて実施することができる。

【0012】本発明は、カオトロピック剤を用いることにより上記種々の問題点を有する有害な有機溶媒を使用する必要がなくなり、しかも有機溶媒除去操作が不要になったために操作手順が簡略化し、DNA鎖損傷の危険性を最小限に止め、短時間に高分子のDNA鎖を高収率で得ることができる。本発明の抽出方法に於ては、血液細胞から有核細胞を分離したものが試料にできることは勿論であるが、全血を用いることができるため、血液試料を各細胞成分に分離する繁雑さが解消し、採取後短時間に血液試料を処理することができる点に於ても極めて優れた発明である。また、本発明の方法により抽出したDNA鎖は例えばPCR法(Polymerase chain reaction)を用いた臨床診断の分野はもちろん、制限酵素切断反応、サザンブロットによる分析等の分野でも利用することができる。

【0013】

【実施例】

実施例1. ヒト新鮮全血0.5mlにサッカロースを0.32M、塩化マグネシウムを5mM、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを1%、アジ化ナトリウムを0.2%含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を0.5ml加えて混合した。その後、12,000rpm、20秒、4℃で遠心分離した。ペリットに上記の溶液を1ml加えて、マイクロチューブミキサー(MT-360、トミー精工製)にて攪拌した。再度遠心分離を行い、上清を取り除いた。更にこの洗浄操作を1回繰り返した。続いて得られたペリットに1%SDS、1mMEDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)200μlと20mg/mlのプロテイナーゼK 10μlを添加した後、37℃で60分間反応させた。その後、最終濃度4.5Mのよう化ナトリウムを加え混合した後、0.5mlイソプロパノールを加え混合した。12,000rpmにて、10分間遠心分離し、DNAを沈殿させた。上清を捨て、沈殿に40%イソプロパノールを1ml添加して洗浄した後乾燥処理し、DNAを得た。得られたDNAをTE緩衝液(EDTAを1mM含む、10mMトリス-塩酸緩衝液、pH8.0)に再度溶解して、得られた溶液の260nmに於ける吸光度を測定しDNAの抽出効率を算出した。また、この溶液をパルスフィールド電気泳動にかけて、得られたDNAの分子量を測定した。結果を表1示す。尚、DNAの抽出効率は、

【式1】

$$= \text{DNA 収量} \div (\text{試料中の白血球数} \times 6 \text{ pg}) \times 100$$

によって求めた。

註) ヒト細胞(白血球)1個当りの全DNA量は6ピコグラムである。

【0014】比較例1. 従来法(フェノールを用いた方法)

ヒト新鮮全血試料(EDTA添加)0.5mlに、サッカロースを64mM、塩化マグネシウムを10mM、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを2%(w/v)含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)を0.5ml加えた。次いで蒸留水で2倍に希釈した上記緩衝液0.3mlを加え、穏やかに攪拌した。氷水中で5分間インキュベートした後、2000rpmで30分間、4℃で遠心分離して核画分を含むペリットを得た。ペリットにNaClを75mM含む24mM EDTA溶液を0.1ml加えて再懸濁させた。更に上記EDTA溶液を0.1ml加えて懸濁後、別の容器に移した。試料に20%SDSを10μl、次いで0.1mgの固形プロティナーゼ*

* Kを加え、攪拌後、37℃で2時間反応させた。0.21mlの水飽和フェノールを加えて混合後、2000rpmで10分間遠心分離し、水層を別の容器に移した。上記フェノール抽出操作を再度繰り返し行った。得られた抽出物について、水飽和フェノール-クロロホルム(=1:1(v/v))で2回、水飽和クロロホルムで3回、抽出操作を行った。次いで常法に従いエタノールを加えてDNAを沈殿させた後、遠心分離して、目的のDNAを得た。得られたDNAをTE緩衝液に再度溶解して、得られた溶液の260nmに於ける吸光度を測定し、得られたDNA量を測定して、上記算出式よりDNAの抽出効率を算出した。また、この溶液をパルスフィールド電気泳動にかけて、得られたDNAの分子量を測定した。結果を表1に併せて示す。

【表1】

表 1

	実施例 1	比較例 1
操作時間(時間)	1.5	3.5
フェノール使用	無し	有り
DNA抽出効率(%)	95	59
OD 260/280	1.96	1.54
DNA分子量 (ダルトン)	7.5×10^6 $\sim 3.0 \times 10^7$	2.5×10^6 $\sim 3.0 \times 10^7$

表1より、本発明を用いたDNA鎖の抽出法では、従来のフェノールを用いた精製法と比較して、より短時間に、高分子量のDNA鎖が高収率で得られることが分かる。また、OD 260/280の値が1.8~2であれば蛋白質の混入が少ないことを示すが(遺伝子工学入門, 43~44頁, 1986年, 南山堂等)、表1の結果より、本発明を用いた方法によると、従来のフェノールを用いた精製法よりも蛋白質の混入の少ない精製度の高いDNA鎖が得られることが分かる。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、全血試料へのタンパク質変性剤及びアルコールの添加とその後の遠心分離操作のみで高分子のDNAを得ることができる。また、本発明の全工程を1つの容器内で行うことで外来DNAの混入を軽減することができる。更に、フェノールなどの有機溶媒を使わないため溶媒除去の操作が不要で、試料の損失が少なく、従って高い収率でDNA鎖を抽出することが可能である。また、本発明では更に、有機溶媒抽出操作中のピペットによるDNA鎖の機械的切断を回避することでゲノムDNAを高分子のまま回収することが可

能になっている。本発明は上記の点に於て、特に優れた * がある。
発明であり、斯業に貢献するところ極めて大なる発明で*

【手続補正書】

【提出日】平成6年1月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は全血液からのDNA鎖の抽出方法及び抽出キットに関する。

【発明の背景】遺伝子疾患の出生前診断や保因子の発見、DNAの多型或は遺伝病や癌などDNAの異常に起因する疾病の原因領域の究明のために、ヒトの遺伝子を抽出、分析する研究が行われている。また、例えばB型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス等のウイルス性疾患、腫瘍、血友病等の遺伝疾患の診断を、DNAを分析して行う方法が最近盛んになりつつある。また、ヒト・ゲノム・プロジェクトに代表されるように、ヒトの全遺伝情報を解析する研究も盛んに行われているが、遺伝子を分析するには傷をつけずに高分子の状態を保ったままゲノムDNAを調製する必要がある。しかしながら原核生物と異なり、真核生物、特にヒトに代表される高等生物のDNA分子は巨大で、攪拌操作等によって容易に切断されてしまうため、十分注意を払っても、全く損傷を与えることなくDNA分子を抽出することは不可能である。またクロマチン等の核蛋白質が強固にDNA分子と結合しているため、これら核蛋白質の除去操作も必要であり、完全なDNAを精製することはできない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】本発明に於て用いられる界面活性剤としては、一般に細胞、細菌等から核酸鎖抽出の際に用いられるものであれば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等、特に限定されることなく挙げられるが、具体的には例えばドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン性界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する。)、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル(例えばローム アンド ハース社商品名:トリトンX-100等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(例えば花王(株)商品名:トゥイーン20等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(例えば花王(株)商品名:トゥイーン80等)、n-オキシル-β-D-グルコシド等の非イオン界面活性剤、例えば3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が好ましく挙げられる。中でも、特に例えば血球細胞を破壊する際にはポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル等の非イオン性界面活性剤が、例えば蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する際にはSDS等の陰イオン性界面活性剤が好ましく用いられる。これらの使用濃度としては、使用する界面活性剤の種類により多少異なるが、例えば血球細胞を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。また、蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。